

DER EINFLUSS VON ACTINOMYCIN D AUF
DIE ERHOLUNG VOM SUBLETALEN STRAHLENSCHADEN
IN MENSCHLICHEN ZELLEN IN - VITRO

JOSEF BAUR

1985

*Diss.
München*

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der
Universität München

Vorstand : Prof. Dr. G. Riethmüller
komm. Leiter

Der Einfluß von Actinomycin D auf die Erholung vom
subletalen Strahlenschaden in menschlichen Zellen
in-vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Josef Baur
aus
Handzell

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. med. K.-R. Trott

Mitberichterstatter : Prof. Dr. G. Riethmüller

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 18.7.1985

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. R. Trott für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die Unterstützung bei der Planung und Ausführung dieser Arbeit und für seine Hilfe und Erfahrung, die er mir zur Verfügung stellte.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Frau Schneider für ihre intensive Betreuung und ihre Hilfe bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Bosse für ihre Mühen bei der Reinigung und Sterilisation des Arbeitsgerätes und bei allen Angestellten des Institutes für das angenehme Arbeitsklima.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methode	2
2.1.	Zelltyp	2
2.2.	Nährmedium	2
2.2.1.	Zusammensetzung von Eagle's Minimum Essential Medium	2
2.2.2.	Zusammensetzung von Hank's Salz- lösung	3
2.2.3.	Zusammensetzung der Trypsinlösung	3
2.2.4.	Zusammensetzung von Solution A	4
2.3.	Färbelösung	4
2.4.	Bestrahlungsquelle	4
2.5.	Arbeits-platz	4
2.6.	Actinomycin D	5
2.6.1.	Klinische Anwendung von Actinomycin D	6
2.7.	Zellklonierung	8
2.8.	Gefrierkonservierung von Zellen	8
2.9.	Zellpassage	9
2.10.	Kolonieausbeute	10
3.	Durchführung der Versuche	12
3.1.	Bestimmung der Strahlendosiseffekt- kurve von HAK Zellen bei Einzeitbe- strahlung	12
3.2.	Bestimmung der Strahlendosiseffekt- kurve bei HAK Zellen bei fraktionierter Bestrahlung	13
3.3.	Ermittlung der Zeit-Überlebensrate- Konzentrationsbeziehung von Act D bei HAK Zellen	13
3.4.	Bestimmung des Erholungseffektes bei gleicher Gesamtstrahlendosis in Abhängig- keit der Erholungszeit bei HAK Zellen	14
3.5.	Interaktion von Actinomycin D und Be- strahlung	15
3.5.1.	Interaktion von Act D und Einzeitbe- strahlung	15

3.5.2.	Interaktion von Act D und fraktio-	16
	nierter Bestrahlung	
3.5.3.	Die Abhängigkeit der Erholung vom	17
	subletalen Strahlenschaden vom Zeit-	
	punkt der Act D-Anwendung	
4.	Ergebnisse	18
4.1.	Strahlendosiseffektkurve bei Ein-	18
	zeitbestrahlung	
4.2.	Strahlendosiseffektkurve von HAK	18
	Zellen bei fraktionierter Be-	
	strahlung	
4.3.	Zeit-Konzentrations-Überlebensrate-	19
	Beziehung von Act D bei HAK Zellen	
4.4.	Erholungseffekt bei gleicher Gesamt-	20
	dosis in Abhängigkeit der Länge des	
	Fraktionierungsintervalles	
4.5.	Anwendung von Act D vor einer Einzeit-	20
	bestrahlung	
4.6.	Anwendung von Act D vor fraktionierter	21
	Bestrahlung (Fraktionierungsintervall:	
	4 Stunden)	
4.7.	Anwendung von Act D vor fraktionierter	22
	Bestrahlung (Fraktionierungsintervall:	
	24 Stunden)	
4.8.	Die Abhängigkeit der Erholung vom sub-	22
	letalen Strahlenschaden vom Zeitpunkt	
	der Actinomycin D-Anwendung	
4.9.	Die Abhängigkeit der Erholung vom sub-	23
	letalen Strahlenschaden vom Zeitpunkt	
	der Actinomycin D-Anwendung	
5.	Diskussion	42
5.1.	Strahlendosiseffektkurve	42
5.2.	Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbe-	44
	ziehung	
5.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den	45
	Kombinationsversuchen	
5.4.	Andere experimentelle Arbeiten	47

5.5.	Auswirkung von Actinomycin D auf HAK Zellen	49
5.6.	Schlußfolgerung aus den Experimenten	52
6.	Zusammenfassung	53
7.	Literaturverzeichnis	54

1. Einleitung

Das 1954 von Vining und Wakesman beschriebene zytostatisch wirksame Antibiotikum Actinomycin D wird heute neben anderen Antibiotika, wie Adriamycin, Bleomycin und Mitomycin C, in der Therapie maligner Erkrankungen des Menschen eingesetzt.

Actinomycin D hat sich besonders beim kindlichen Wilms'Tumor und bei embryonalen Geschwülsten, wie Sarkomen und Teratomen, bewährt. Es wird heute in komplexen Therapieprotokollen mit anderen Zytostatika und mit Bestrahlung kombiniert. Man hofft hierbei auch auf einen strahlensensibilisierenden Effekt gegenüber Gammastrahlen auf die Zellen. Dieser wurde bei chinesischen Hamsterzellen nachgewiesen und in der Klinik an Haut- und Lungenveränderungen bestrahlter Patienten beobachtet.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine eventuelle radiosensibilisierende Wirkung von Act D auf Zellen, die aus gesunden menschlichen Geweben isoliert worden sind, aufzuzeigen. Vor allem soll untersucht werden, ob Act D die Reparatur der subletalen Strahlenschäden der Zelle verhindert.

2. Material und Methode

2.1. Zelltyp

Für diese Arbeit wurden gesunde menschliche Nierentubulusepithelzellen (HAK = Human Adult Kidney) verwendet. Die Verdoppelungszeit der Zellen beträgt circa 24 Stunden. Einmal in der Woche mußten sie in ein frisches Nährmedium passagiert werden.

2.2. Nährmedium

Das Nährmedium bestand aus Eagle's Minimum Essential Medium und Hank's Salzlösung. Die Substanzen der Lösungen wurden vom Labor in fertiger Zusammensetzung in Pulverform bezogen und je nach Bedarf hergestellt, indem sie in Aqua bidest. gelöst wurden. Erst nach vollständiger Lösung der Substanzen wurde Natriumbikarbonat und Natronlauge zugegeben. Danach wurden die Lösungen steril durch ein Filter mit 0.2 µm Porengröße filtriert. Zusätzlich wurden noch 10 % viren- und mykoplasmenfreies Neugeborenenkälberserum und 100 mg/l Neomycinsulfat (Bykomycin^R) zugegeben.

2.2.1. Zusammensetzung von Eagle's Minimum Essential Medium

	mg/l
L-Arginin	105.0
L-Cystin	24.0
L-Glutamin	292.0
L-Histidin	31.0
L-Isoleucin	52.5
L-Leucin	52.4

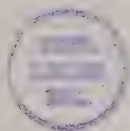
	mg/l
L- Lysin	58.0
L-Methionin	15.0
L-Phenylalanin	32.0
L-Threonin	48.0
L-Thryptophan	10.0
L-Thyrosin	36.0
L-Valin	46.0
Cholinchlorid	1.0
Folsäure	1.0
I-Inosit	2.0
Nicotinamid	1.0
D-Panthothensäure-Ca-Salz	1.0
Pyridoxal HCl	1.0
Riboflavin	0.1
Thiamin HCl	1.0
NaHCO ₃	350.0
NaOH 1 n	2.0 ml
plus Hank's Salzlösung wie in 2.2.2 angegeben.	

2.2.2. Zusammensetzung von Hank's Salzlösung

	mg/l
NaCl	8000.0
KCl	400.0
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	60.0
KH ₂ PO ₄	60.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	200.0
CaCl ₂ wasserfrei	140.0
Glucose	1000.0
Phenolrot	10.0

2.2.3. Zusammensetzung der Trypsinlösung

2 g Trypsin in 1000 ml Solution A (siehe 2.2.4.)



2.2.4. Zusammensetzung von Solution A

	mg/l
NaCl	330.0
KCl	400.0
NaHCO ₃	350.0
NaHPO ₄ 2H ₂ O	60.0
KH ₂ PO ₄	60.0
Phenolrot	20.0

2.3. Färbelösung

Zum Anfärben der Zellen zur Versuchsauswertung wurde eine Methylenblaulösung verwendet. Diese besteht aus Methylenblau gesättigt in 150 ml Äthylalkohol, 500 ml Aqua dest. und 5 ml einprozentige Kaliumlauge.

2.4. Bestrahlungsquelle

Zur Bestrahlung der Zellen wurde ein Cs¹³⁷-Quelle mit einer Dosisleistung von 1.1 Gy/min verwendet. Bei dieser Bestrahlungseinrichtung der Firma Wälischmüller, Typ HWM 2000, werden zwei opponierende Quellen in einem geschlossenem System durch Druckluft in die Bestrahlungsposition gebracht. Dieses System gewährleistet ein höchstmögliches Maß an Strahlenschutz und Dosishomogenität.

2.5. Arbeitsplatz

Alle Experimente wurden unter keimfreien Bedingungen in einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz mit Luftzufuhr durch Keimfilter durchgeführt. Nach Beendigung der Arbeit wurde die Arbeitsfläche jedesmal mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert

und in der arbeitsfreien Zeit mit kurzwelligem UV-Licht sterilisiert.

Sämtliche Materialien, wie Pipetten, Reagenzgläser, Glaskolben und Wachstumsflaschen, wurden im Heißluftsterilisator sterilisiert.

2.6. Actinomycin D

Als Zytostatikum wurde Actinomycin D (Lyovac-Cosmegen^R) der Firma Sharp & Dohme verwendet. Jede Durchstechflasche enthält 0.5 mg Actinomycin D und 20 mg Mannit als lyophilisiertes Pulver.

Der Inhalt einer Flasche wurde in 2 ml sterilem Aqua bidest. unter sterilen Kautelen gelöst. Actinomycin D wurde 1954 erstmals von Vining und Wakesman isoliert und beschrieben. Es gehört zu den Actinomycinen, einer komplexen Gruppe von Antibiotika, die von verschiedenen Streptomycesarten gewonnen werden.

Actinomycin D besteht aus einem ebenen Phenoxazonring, der säureamidartig an die terminalen Aminogruppen je eines Pentapeptides gebunden ist. Die endständigen Aminosäuren der Peptide sind jeweils durch einen Laktonring verbunden.

Das Antibiotikum Actinomycin D hat eine Hemmwirkung auf verschiedene Bakterien und Pilze. Es ist aber außerordentlich zytotoxisch und hemmt das Wachstum verschiedener Neoplasmen. Es wird deshalb ausschließlich zur Therapie maligner Tumoren verwendet.

Diese zytotoxischen Eigenschaften können durch folgende Gegebenheiten erklärt werden:

- Act D hemmt die Proteinsynthese, indem es

stabile Komplexe mit der DNA bildet und dabei die DNA-abhängige RNA-Polymerase von der Bindungsstelle verdrängt (Kirk 1960; Goldberg und Rabinowitz 1962).

- Es hemmt die RNA-Polymerase bei niedrigen Dosen und zusätzlich bei hoher Dosierung die DNA-Polymerase (Reich et al. 1961; Hurwitz et al. 1962).
- Es bewirkt durch eine Komplexbildung mit der DNA eine sterische Veränderung der DNA bzw. verursacht eine lokale Verdrehung des Basenstranges an der Bindungsstelle (Gellert et al. 1965; Gursky 1969).

2.6.1. Klinische Anwendung von Actinomycin D

Heute wird Act D hauptsächlich in Kombination mit anderen Zytostatika oder in Verbindung mit Strahlentherapie angewandt. Am besten sprechen auf diese Therapie die kindlichen Wilms-Tumoren sowie Rhabdomyosarkome, Neoplasmen des Hodens und des Uterus und Knochensarkome an.

Sehr gute Erfolge konnten beim Wilms-Tumor, einem embryonalen Adenosarkom der Nieren, beobachtet werden, wenn Act D mit einer Strahlenbehandlung kombiniert wurde. Nach Farber (1960) konnten bis zu 63 % Heilungen erzielt werden.

Keine so guten Ergebnisse zeigt das Rhabdomyosarkom. Jedoch kann durch eine Kombinationstherapie eine Größenabnahme des Tumors erreicht werden, die oft erst eine Radikaloperation ermöglicht.

Tumoren und Metastasen der Genitalorgane (embryonale Tumoren und maligne Teratome) können durch Kombinationsbehandlung meist nur palliativ beeinflusst werden.

Actinomycin D wirkt, wie alle anderen Zytostatika, sehr toxisch. Es ruft sehr stark schwankende Reaktionen hervor, die nur teilweise dosisabhängig sind. Die Symptome treten meistens erst 2 - 4 Tage nach Behandlungsende auf und erreichen nach 1 - 2 Wochen ihren Höhepunkt. Nebenwirkungen wie Übelkeit und Kopfschmerzen treten jedoch schon kurz nach der Applikation auf. Eine Knochenmarkdepression und damit eine schwere Beeinträchtigung des hämatopoetischen Systems zeigt sich in Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie und Retikulozytopenie.

Anorexie, Bauchschmerzen, Diarrhoe und Magen-Darm-Ulzera sind Ausdruck der Darmepithelschädigung. Dermatologische Nebenwirkungen zeigen sich in Alopezie, Akne und Exanthenen. Vor allem strahleninduzierte Hautreaktionen können verstärkt werden. Auch Strahlendosen, die sonst zu keiner Hautreaktion führen, können in Kombination mit Act D zu schweren Strahlendermatitiden führen.

Wurde die Lunge bei Metastasen eines Wilms-Tumores nach vorausgegangener Act D Behandlung bestrahlt, so wurden tödliche Strahlenpneumonitiden beobachtet, auch wenn sonst tolerierte Strahlendosen angewandt wurden. Deshalb empfiehlt Phillips bei einer Bestrahlung der Lunge mit vorgezogener, gleichzeitiger oder anschließender Behandlung mit Act D, die üblichen Strahlendosen um 30 - 40 % zu reduzieren.

Auch bei Bestrahlung des Abdomens zur Therapie des Wilms-Tumors in Kombination mit Act D wurden schwerwiegende Veränderungen vor allem der parenchymatösen Organe beobachtet.

2.7. Zellklonierung

Der im Labor vorhandene Vorrat an HAK Zellen war im Laufe der vielen vorhergegangenen Passagen durch polyploide Zellen, die Riesenzellen bildeten, zu einem hohen Prozentsatz "verunreinigt". Damit die Versuche aussagekräftig wurden, benötigte man zu ihrer Durchführung einen möglichst reinen diploiden Zellstamm. Diese "Reinigung" ließ sich durch eine Klonierung erreichen.

Dazu wurden je 200 Zellen in Petrischalen eingesetzt, in die vorher Glassplitter gebracht wurden. Durch die niedrige Zellkonzentration bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß sich einige der Zellen einzeln auf je einen Glassplitter absiedeln und darauf eine Kolonie bilden würden. Nach 10 Tagen wurden schöne Kolonien aus diploiden Zellen unter dem Mikroskop bei sterilen Bedingungen isoliert und über mehrere Passagen vermehrt. Erst nach etwa 5 - 8 Passagen konnte man entscheiden, ob die isolierte Zelllinie stabil war und somit für die folgenden Versuche geeignet. Einer der so gewonnenen Klone wurde für die folgenden Experimente verwendet.

2.8. Gefrierkonservierung von Zellen

Durch häufige Passagen besteht die Gefahr, daß die Zellkultur durch Bakterien oder Pilze infiziert wird, oder eine Verschiebung der Zelleigenschaften auftritt. Es ist deshalb vorteilhaft, eingefrorene Reserven anzulegen, auf die man zurückgreifen kann. Dazu werden möglichst dicht bewachsene Kulturflaschen hergenommen und analog der beschriebenen Passagierung (siehe unten) verfahren. Die Trypsinlösung wird nach 2 min. Einwirkzeit abgegossen und

der in der Flasche verbliebene Rest weitere 7 min. einwirken lassen. Hat sich nun der Zellrasen von der Glasunterlage gelöst, so werden 2 ml Eagle's Medium, das 20 % Neugeborenenkälberserum und 2 % DMSO enthält zugegeben. Die Zellsuspension wird sofort in 2 ml-Ampullen eingefüllt und in Eiswasser kaltgestellt, um die Aktivität des Trypsins zu stoppen.

DMSO (= Dimethylsulfoxyd) soll die Kristallbildung des Zellwassers verhindern. Die Zellen werden in einem Kältethermostat auf -30°C mit einer Geschwindigkeit von -1°C pro min. abgekühlt. Danach werden sie in flüssigen Stickstoff gebracht und somit auf -196°C gekühlt.

Werden nun wieder frische Zellen benötigt, so kann man jederzeit Zellen der gleichen Linie mit gleichen Eigenschaften auftauen und weiterzüchten. Das Auftauen muß rasch erfolgen, um die Bildung von großen Eiskristallen möglichst zu verhindern. Mit den aufgetauten Zellen wird weiterhin mit der unter 2.9. beschriebenen Weise verfahren.

2.9. Zellpassage

Zu allen Versuchen, wie auch zur Zellkultivierung, wurden sterile Vierkantflaschen aus Glas benutzt, die mit Aluminiumfolie verschlossen wurden. Bei jedem Öffnen und Wiederverschließen der Flaschen wurde der Flaschenhals und die Aluminiumfolie mit einer Bunsenbrennerflamme abgeflammt. Alle verwendeten Lösungen wurden im Warmwasserbad auf 37°C erwärmt.

War der Flaschenboden mit einem einschichtigen dichten Zellrasen bewachsen, mußten die Zellen in ein frisches Nährmedium überführt werden. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und für fünf Minuten Solution A zugegeben, um die zweiwertigen Calcium-

und Magnesiumionen auszuwaschen.

Nach dem Absaugen von Solution A wurden 2 ml Trypsinlösung zugegeben, die 5 min. auf die Zellen einwirkte. Die Kulturflaschen wurden während dieser Zeit mittels einer Laborheizplatte bei 37°C warmgehalten. Gegen Ende der Einwirkzeit löste sich der Zellrasen von der Glasunterfläche und konnte mit einer 1 ml-Pipette durch Aufsaugen und Ausblasen in eine Einzellsuspension überführt werden. Diese wurde durch Eagle's Medium verdünnt, damit der Serumanteil der Nährlösung das Trypsin stoppte. Mit Hilfe einer Bürkerzählkammer wurde die Zellkonzentration ermittelt. Anschließend konnte man durch eine Verdünnungsreihe jede beliebige Zellkonzentration herstellen. Zur Weiterkultivierung wurden jeweils 20 000, 50 000 und 100 000 Zellen mit 9 ml Nährlösung in Vierkantflaschen gegeben. Diese steril verschlossenen Flaschen wurden im Brutschrank bei 37°C in wassergesättigter Luft bei 5 % CO₂-Gehalt bebrütet.

Nach einer Woche mußte die Zellkultur erneut passagiert werden, um ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden und damit den Verlust der Zellkultur zu verhindern.

2.10. Kolonieausbeute

Zu allen Versuchen wurde eine Kontrolle angesetzt, um einen Standartwert, die plating efficiency oder P. E. zu erhalten. Dieser Wert gibt Auskunft über die Rate der überlebenden Zellen pro Flasche und ist gleichzeitig ein Maß, wie genau beim Pipettieren und Zählen vorgegangen wurde. Dazu wurden bei allen Versuchen jeweils 4 Flaschen mit 200 bzw. 400 Zellen zusammen mit 9 ml Nähr-

lösung beschickt und 10 Tage im Brutschrank bebrütet. Nach dieser Zeit hatte sich aus jeder überlebenden und teilungsfähigen Zelle ein Klon gebildet.

Die Flaschen der Kontrollen wurden jeweils zusammen mit den Flaschen der Versuche aus dem Brutschrank genommen. Nach dem Abkühlen wurde das überstehende Medium abgesaugt und durch etwa 5 ml Methylenblaulösung ersetzt.

Nach einer Stunde Einwirkzeit waren alle Kolonien angefärbt, so daß die überstehende Lösung abgesaugt werden konnte.

Unter dem Stereomikroskop wurden dann alle Kolonien gezählt, die aus mehr als 50 Einzelzellen bestanden. Die plating efficiency (P. E. in %) wurde sodann nach folgender Formel errechnet:

$$\text{P. E. (\%)} = \frac{\text{gezählte Kolonien} \times 100}{\text{eingesäte Zellzahl}}$$

Diese P. E. diente bei den Experimenten jeweils als Bezugszahl zur Errechnung der Überlebensrate.

3. Durchführung der Versuche

Um die Versuche zur Untersuchung einer Interaktion von Act D und Gammastrahlen bei HAK Zellen durchführen zu können, war es notwendig, verschiedene Vorversuche durchzuführen.

Zuerst mußte eine Strahlendosiseffektkurve, sowohl bei Einzeitbestrahlung als auch bei fraktionierter Bestrahlung ermittelt werden. Ebenso war es notwendig die Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung von Act D bei HAK Zellen zu ermitteln. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte abgeschätzt werden, wie hoch die Zelleinsaat sein mußten, um noch brauchbare Kolonien ausbeuten bei den Interaktionsversuchen zu erhalten.

3.1. Bestimmung der Strahlendosiseffektkurve von HAK Zellen bei Einzeitbestrahlung

Zur Ermittlung der Strahlendosiseffektkurve wurden Zellen durch eine normale Passage gewonnen. Es wurden in jede Flasche jeweils 400 oder 4000 Zellen in 10 ml Medium eingesät. Jeder Wert der Reihe ergibt sich aus mindestens 4 Kulturflaschen. Die Versuchsreihe wurde fünfmal wiederholt. Die Flaschen wurden über Nacht im Brutschrank bebrütet, damit sich die Zellen auf dem Flaschenboden festsetzten, sich aber noch nicht geteilt hatten. Am darauffolgenden Morgen wurden die Zellen mit Strahlendosen zwischen 2.6 Gy und 18.5 Gy bestrahlt. Nach zehn- bis zwölftägiger Bebrütungszeit wurden die gebildeten Kolonien mit Methylenblau angefärbt und unter dem Stereomikroskop ausgezählt.

In Abb. 1 sind die Überlebensraten graphisch dargestellt.

3.2. Bestimmung der Strahlendosiseffektkurve von HAK Zellen bei fraktionierter Bestrahlung

Nach den Vorbereitungen analog zur Einzeitbestrahlung wurden die Zellen, nachdem sie über Nacht inkubiert waren, mit 4 x 3 Gy, 4 x 5 Gy und 4 x 7 Gy bestrahlt. Die Intervalle zwischen den einzelnen Fraktionen betrugen 3.5 Stunden. Während dieser Zeit wurden die Zellen bei 37°C bebrütet. Gleichzeitig wurden Zellen mit einer Einzeldosis von 12 Gy und 18 Gy zur Kontrolle bestrahlt. Ebenso wurde eine unbehandelte Kontrolle angesetzt. Nach 10 Tagen Bebrütungszeit wurden die Flaschen nach oben beschriebener Methode gefärbt und ausgezählt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 2 dargestellt.

3.3. Ermittlung der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung von Act D bei HAK Zellen

Diese Experimente hatten zur Absicht, die Überlebensraten von HAK Zellen bei verschiedenen Dosen Act D und nach verschiedenen langen Einwirkzeiten zu ermitteln. Die Konzentrationen dabei waren 1 µg/ml und 0.5 µg/ml; die Expositionszeiten 1, 2, 4 und 6 Stunden.

Bei diesen Versuchen wurden jeweils verschiedene Konzentrationen und eine Kontrolle pro Inkubationsintervall angesetzt. Jeder Versuchswert ergibt sich aus 4 Flaschen. Die Zellen wurden nach der üblichen Methode gewonnen, eingesät und über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde den Zellen Act D in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Dazu wurde der Inhalt einer Ampulle Lyovac-Cosmegen^R mit 0.5 mg Act D in 2 ml sterilem Aqua bidest. gelöst

und in einer Verdünnungsreihe mit Hank's Salz-
lösung auf die benötigte Konzentration gebracht.
Das Wachstumsmedium wurde aus den Flaschen abge-
saugt und 10 ml Hank's Lösung mit dem Act D auf-
gebracht. Nach Beendigung der Expositionszeit
wurde die Act D-Lösung aus den Flaschen abge-
saugt. Die Flaschen mußten anschließend noch zwei-
mal sehr sorgfältig mit Hank'scher Lösung gespült
werden, bevor wieder frisches Eagle Medium aufge-
bracht wurde. Dies war notwendig, da sich Act D
nicht nur an Zellen, sondern auch an Glas binden
kann und von dort wieder freigegeben werden kann
(Elkind et al. 1969). Die Flaschen wurden für
10 - 12 Tage im Brutschrank belassen und danach
mit Methylenblau gefärbt. Die überlebenden
Kolonien wurden nach bekannter Methode bestimmt.
Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 3
dargestellt.

3.4. Bestimmung des Erholungseffektes bei gleicher Gesamtstrahlendosis in Abhängigkeit der Er- holungszeit bei HAK Zellen

Die Vorbereitungen zu diesen Experimenten wurden
nach oben beschriebener Weise durchgeführt. Die
Zellen wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.
Jeder Versuchswert ergibt sich aus 6 Flaschen.
Die Zellen wurden fraktioniert mit 2 x 9 Gy bei
unterschiedlichen Erholungszeiten bestrahlt. Die
Intervalle waren 0, 1, 2, 4 und 6 Stunden.
Während dieser Zeit waren die Zellen im Brut-
schrank inkubiert. Gleichzeitig wurde eine un-
bestrahlte Kontrolle angesetzt. Nach 10 Tagen
Bebrütungszeit wurden die Flaschen gefärbt und
die Kolonien bestimmt.
Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt.

3.5. Interaktion von Actinomycin D und Bestrahlung

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurde nur eine Behandlungsart, entweder Bestrahlung oder Act D angewandt. Jetzt wurde versucht, beide Modalitäten zu kombinieren. Ziel dieser Versuche war es, eventuelle Interaktionen festzustellen. Dabei wurde den HAK Zellen bei allen Versuchen eine Act D-Konzentration von $0.5 \mu\text{g/ml}$ für 2 Stunden zugesetzt. Die behandlungsfreie Zeit nach Entfernung des Act D aus den Kulturflaschen betrug immer 2 Stunden. Ebenso betrug die Zeit zwischen Bestrahlung und Anwendung von Act D 2 Stunden. Das behandlungsfreie Intervall zwischen zwei Bestrahlungsfractionen betrug immer 4 Stunden.

Bei jedem Versuch wurde eine Kontrolle unbehandelter Zellen (P. E.), sowie eine Kontrolle nur mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ Act D behandelter Zellen und eine Kontrolle bestrahlter Zellen angesetzt. Jeder Versuchswert ergibt sich aus dem Durchschnittswert von 6 Flaschen. Die erforderlichen Zelleinsaatn konnten aus der Strahlendosis-effektkurve und den Ergebnissen der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung abgeschätzt werden. Bei all diesen Versuchen war es nötig eine zeitliche Koordination zu erreichen, um die 2 Stunden Act D Vorbehandlung und die behandlungsfreien Intervalle genau einzuhalten. Soweit dies nicht geschehen ist, wurden die Ergebnisse jener Versuche nicht berücksichtigt.

3.5.1. Interaktion von Act D und Einzeitbestrahlung

Die Zellen wurden in beschriebener Weise vorbereitet und über Nacht inkubiert. Nach einer Vorbehandlung mit Act D, $0.5 \mu\text{g/ml}$ für 2 Stunden, wurden die Zellen nach einem behandlungsfreiem Intervall von

weiteren 2 Stunden mit 6 Gy, 9 Gy und 12 Gy bestrahlt. Gleichzeitig wurde eine unbehandelte Kontrolle (P. E.), eine Kontrolle nur mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Act D behandelt und eine Kontrolle nur mit 6, 9 und 12 Gy bestrahlt, angesetzt. Nach 10 - 12 Tagen Bebrütungszeit wurden die überlebenden Zellen nach üblicher Methode bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt.

3.5.2. Interaktion von Act D und fraktionierter Bestrahlung

Die Zellen wurden in oben beschriebener Weise vorbereitet. Gleichzeitig wurde eine unbehandelte Kontrolle (P. E.) sowie eine Kontrolle nur mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ für zwei Stunden angesetzt. Der eigentliche Versuch besteht aus zwei Gruppen:

- Einmal wurden die Zellen mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ für 2 Stunden vorbehandelt und nach einem behandlungsfreiem Intervall von 2 Stunden wurde die erste Bestrahlungsfraktion von 6 Gy appliziert. Nach dem Fraktionierungsintervall von 4 Stunden wurden die Zellen mit einer 2. Fraktion von 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt.
- Parallel dazu wurde die zweite Gruppe nur mit Gammastrahlen behandelt. Die erste Fraktion betrug hier 10 Gy. - Die Überlebensrate bei 10 Gy entspricht in etwa der nach 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Act D für 2 Stunden plus 6 Gy Bestrahlung. - Nach einem Fraktionierungsintervall von 4 Stunden wurde die 2. Fraktion von 4, 6, 8 und 10 Gy appliziert.

Analog dazu wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der das Fraktionierungsintervall 24 Stunden betrug. Hier wurden als zweite Fraktion 6, 8, 10 und 12 Gy angewandt. Bei dieser Reihe wurden die gleichen Kontrollen wie in der vorhergehenden angesetzt.

3.5.3. Die Abhängigkeit der Erholung vom sublethalen Strahlenschaden vom Zeitpunkt der Act D-Anwendung

Auch bei diesen Versuchen wurden die üblichen Kontrollen (P. E., Act D-Behandlung ohne Bestrahlung und Bestrahlung allein) angesetzt. Der Versuch selbst gliedert sich in drei Gruppen:

Gruppe 1: Die Zellen werden mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ Act D für 2 Stunden vorbehandelt. Nach einem behandlungsfreiem Intervall von 2 Stunden erhalten die Zellen eine Einzeitbestrahlung von 12 Gy.

Gruppe 2: Nach einer Vorbehandlung mit Act D, wie in der ersten Gruppe, werden die Zellen mit 2×6 Gy im Abstand von 4 Stunden bestrahlt.

Gruppe 3: Die Zellen werden fraktioniert mit 2×6 Gy bestrahlt. Während des Fraktionierungsintervalles werden sie mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ Act D für 2 Stunden behandelt.

Analog zu dieser Reihe wird eine weitere Versuchsreihe durchgeführt bei der die Gesamtstrahledosis 18 Gy (bei Fraktionierung 2×9 Gy) beträgt.

4. Ergebnisse

4.1. Strahlendosiseffektkurve bei Einzeitbestrahlung

In Abb. 1 sind die durchschnittlichen Überlebensraten jedes Versuches einzeln dargestellt. Jeder Punkt ergibt sich aus dem Durchschnitt der Überlebensraten von vier Kulturflaschen.

Es zeigt sich bei halblogarithmischer Darstellung eine typische Dosiswirkungskurve für Gammastrahlen mit einer Schulter und Übergang in eine Exponentialfunktion. Die D_0 , d. h. diejenige Dosis, die im exponentiellen Verlauf der Dosiseffektkurve den Anteil der jeweils noch lebenden Zellen auf 37 % reduziert, beträgt 1.9 Gy. Verlängert man diesen Teil der Kurve mit einer Geraden in Richtung Ordinate, so ergibt sich als Schnittpunkt mit der Ordinate eine Extrapolationszahl (n) von 66. Zieht man eine Parallele zur Abszisse durch 100 % Überlebensrate, so erhält man im Schnittpunkt mit der Verlängerung der Kurvengeraden D_q als Maß für die Weite der Schulter. D_q beträgt in dieser Dosis-effektkurve 8 Gy.

Nach einer Strahlendosis von 7 Gy überleben noch 50 % und nach 15 Gy noch circa 2.5 % der Zellen.

4.2. Strahlendosiseffektkurve von HAK Zellen bei fraktionierter Bestrahlung

Die Zellen wurden in vier Fraktionen mit gleichmäßigen Intervallen von 3.5 Stunden bestrahlt.

Bei halblogarithmischer Darstellung der Überlebensraten erhält man auch hier eine Dosiswirkungskurve mit Schulter und Übergang in eine Exponentialfunktion.

Im Vergleich zur Dosiseffektkurve bei Einzeitbe-

strahlung ist hier die Schulter mit einer D_q von 11.2 Gy weiter und die Gerade mit einer D_o von 3 Gy flacher. Bei 15 Gy Gesamtdosis überleben hier noch ca. 10 % und bei 26.5 Gy noch ca. 0.1 % der Zellen.

Die gleichzeitig ermittelte Dosiswirkungskurve bei Einzeitbestrahlung zeigt eine D_q von 6.5 Gy und eine D_o von 1.6 Gy. Die Schulter im niedrigen Dosisbereich dieser Kurve wurde aus der Fraktionierungskurve konstruiert.

Ausgehend von der Beobachtung, daß bei fraktionierter Bestrahlung mit gleich hohen Fraktionen und gleichlangen Intervallen die Wirksamkeit jeder Fraktion gleich ist, läßt sich die Wirkung der Einzelfraktion durch einfache Division der Gesamtwirkung durch die Zahl der Fraktionen errechnen, d. h. im speziellen Fall wird der log der Überlebensrate durch 4 dividiert und delogarithmiert, um die Überlebensrate bei alleiniger Fraktionsdosis zu gewinnen.

4.3. Zeit-Konzentrations-Überlebensrate-Beziehung von Act D bei HAK Zellen

Es wurde die Beziehung zwischen Einwirkzeit und Überlebensrate bei 0.5 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$ Act D ermittelt. Die Ergebnisse ergeben, im halblogarithmischen Maßstab, Geraden.

Actinomycin D vermindert die Überlebensrate von HAK Zellen nach einer Exponentialfunktion. Mit Zunahme der Einwirkzeit ist eine deutliche Abnahme der überlebenden Zellen verbunden. Ebenso vermindert eine Erhöhung der Konzentration die Überlebensrate. Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ Act D überleben nach 2 Stunden noch ca. 15 % und nach 4 Stunden noch ca. 6 % der Zellen. Bei 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Act D überleben nach 2 Stunden noch ca. 40 % und nach 6 Stunden noch ca. 9 % der Zellen.

4.4. Erholungseffekt bei gleicher Gesamtdosis in Abhängigkeit der Länge des Fraktionierungsintervalles

Die Zellen dieses Versuches wurden alle mit 2×9 Gy, also 18 Gy Gesamtdosis, bestrahlt. Die Intervalle zwischen den einzelnen Fraktionen betrugen 0, 1, 2, 4 und 6 Stunden. Jeder Punkt der graphischen Darstellung (Abb. 4) stellt den Mittelwert jeweils eines Versuches dar und ergibt sich aus 6 Flaschen. Diejenigen Zellen, die keine Erholungszeit zwischen den Fraktionen hatten, haben die geringste Überlebensrate mit ca. 1 %. Bei einer Stunde Erholungszeit zwischen den Fraktionen stieg die Überlebensrate auf 2.5 % und bei zwei Stunden auf 4 % an. Die Zunahme der Überlebensrate wird mit steigender Dauer des Intervalls immer kleiner, so daß bei vier Stunden Intervalllänge ca. 5 % und nach sechs Stunden weniger als 6.5 % der Zellen überleben. Bei halblogarithmischer Darstellung ergibt sich ein Ast einer Parabel, der bei 1 % die Ordinate schneidet und sich bei ca. 8 % einer Parallelen zur Abszisse angleicht.

Man kann annehmen, daß nach vier bis sechs Stunden die Reparatur der subletalen Strahlenschäden bei HAK Zellen abgeschlossen ist. Eine weitere Ausdehnung der Erholungszeit erbringt keine wesentliche Steigerung der Überlebensrate.

4.5. Anwendung von Act D vor einer Einzeitbestrahlung

Ziel dieser Versuche war es eine eventuelle Verstärkung der Strahlenwirkung bei HAK Zellen nach Vorbehandlung mit Act D herauszufinden.

Es wird eine Dosiswirkungskurve nach zweistündiger Vorbehandlung der Zellen mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ Act D (Abb. 5) ermittelt. Gleichzeitig wird eine Kontrolldosis-

wirkungskurve nur mit Bestrahlung ermittelt. Die D_0 dieser Kontrollkurve beträgt 2.3 Gy und die D_q 6.8 Gy. Die Extrapolationszahl (n) läßt sich mit 21 angeben.

Nach Vorbehandlung mit Act D und folgender Strahlenbehandlung liegt die daraus resultierende Kurve unter der Kontrollkurve ohne Act D. Die Überlebensraten dieser Kurve sind auf 100 % Überlebensrate der Act D-Kontrolle normiert. Die D_0 beträgt hier 1.7 Gy und die D_q 5.6 Gy. Die Extrapolationszahl (n) ist 24.

In der Kontrollkurve bei Einzeitbestrahlung überleben bei 12 Gy noch 10 % der Zellen. Nach Vorbehandlung mit Act D und Normierung der Überlebensraten auf die Act D-Kontrolle überleben bei 12 Gy 2.5 % der Zellen.

4.6. Anwendung von Actinomycin D vor fraktionierter Bestrahlung (Fraktionierungsintervall: 4 Stunden)

In diesem Experiment werden die Überlebensraten von HAK Zellen bei fraktionierter Bestrahlung nach Act D Vorbehandlung einer gleichzeitig ermittelten unbehandelten Kontrolle gegenübergestellt (Abb. 6). Bei Behandlung der Zellen mit 0.5 µg/ml Act D und einer Bestrahlungsfraction von 6 Gy überleben noch 20 - 25 % der Zellen. Dies entspricht einer Überlebensrate nach 10 Gy Bestrahlung in der unbehandelten Kontrolle. Nach 4 Stunden wird eine zweite Bestrahlungsdosis appliziert. Die D_0 nach Act D Vorbehandlung liegt mit 2.35 Gy unter der in der unbehandelten Kontrolle mit 3.5 Gy. Auch die Schulterweite (D_q) ist mit 1.05 Gy schmaler als diejenige der Kontrolle mit 1.8 Gy. Nach Applikation der 2. Fraktion von 10 Gy überleben nach Act D Vorbehandlung noch 0.5 % der Zellen gegenüber 2.5 % in der unbehandelten Kontrolle.

4.7. Anwendung von Actinomycin D vor fraktionierter Bestrahlung (Fraktionierungsintervall: 24 Stunden)

Dieses Experiment (Abb. 7) unterscheidet sich von den vorhergehenden (Abb. 6) nur durch ein längeres Fraktionierungsintervall.

Hier beträgt die D_0 nach Act D Vorbehandlung 3.3 Gy gegenüber 4.7 Gy der unbehandelten Kontrolle.

Nach einer 2. Fraktion von 10 Gy überleben bei Vorbehandlung mit Act D noch 1.3 % der Zellen.

In der unbehandelten Kontrolle sind es 5.5 %.

4.8. Die Abhängigkeit der Erholung vom subletalen Strahlenschaden vom Zeitpunkt der Actinomycin D Anwendung

Ziel dieser Experimente war es, anhand verschiedener Kombinationsmöglichkeiten herauszufinden, bei welchem Anwendungsmodus von Act D und Bestrahlung der größte Effekt erzielt wird.

Actinomycin D wurde sowohl vor einer Einzeitbestrahlung, als auch vor einer fraktionierten Bestrahlung und im Intervall einer fraktionierten Bestrahlung angewandt.

Wurde Act D vor einer Einzeitbestrahlung mit 12 Gy gegeben, so überlebten 1.4 % der Zellen.

Wurde Act D vor einer fraktionierten Bestrahlung mit 2 x 6 Gy gegeben, so überlebten 3.3 %.

Ebenso überlebten 3.3 % der Zellen, wenn Act D im Fraktionierungsintervall gegeben wurde.

Die Überlebensraten sind Durchschnittswerte aus fünf Versuchen und auf 100 % Überlebensrate der Act D-Kontrolle normiert.

Eine gleichzeitig ermittelte Kontrolle ohne Act D Behandlung zeigt bei Einzeitbestrahlung mit 12 Gy eine durchschnittliche Überlebensrate von 7.5 %.

Bei fraktionierter Bestrahlung mit 2 x 6 Gy über-

leben durchschnittlich 22 % der Zellen.

Sowohl in der Kontrolle, als auch bei kombinierter Anwendung von Act D und Gammastrahlen wurde die Überlebensrate durch Fraktionierung der Bestrahlungsdosis um den Faktor 3 gesteigert.

Die Anwendung von Act D während des Fraktionierungsintervalles bringt keine anderen Ergebnisse als die Anwendung vor der Bestrahlung.

4.9. Die Abhängigkeit der Erholung vom subletalen Strahlenschaden vom Zeitpunkt der Actinomycin D-Anwendung

Diese Versuchsreihe (Abb. 9) wurde analog der vorhergehenden (Abb. 8) durchgeführt. Die Gesamtstrahlendosis beträgt jedoch 18 Gy.

Hier beträgt die Überlebensrate 0.04 % bei der Anwendung von Act D vor einer Einzeitbestrahlung mit 18 Gy. Bei der Act D-Anwendung vor einer fraktionierten Bestrahlung mit 2 x 9 Gy beträgt die Überlebensrate 0.3 %. Ebenso wurde eine Überlebensrate von 0.3 % ermittelt, wenn Act D während des Fraktionierungsintervalles angewandt wurde. Die Überlebensraten sind Durchschnittswerte aus jeweils fünf Versuchen und auf 100 % Überlebensrate der Act D-Kontrolle normiert.

In der gleichzeitig ermittelten Kontrolle ohne Act D-Behandlung überlebten nach 18 Gy Einzeitbestrahlung 1.8 % und nach 2 x 9 Gy 6.5 % der Zellen.

Abb. 1

Die Abhängigkeit der Überlebensrate von HAK Zellen von der Strahlendosis bei Einzeitbestrahlung mit Gammastrahlen.

Jeder aufgetragene Punkt entspricht dem Mittelwert der Überlebensrate bei der betreffenden Dosis aus einem Versuch. Man erhält eine Dosis-effektkurve mit Schulter im niedrigen Dosisbereich mit Übergang in eine Exponentialfunktion. Die Bestimmungsgrößen sind:

$$D_0 = 1.9 \text{ Gy}; \quad D_q = 8 \text{ Gy}; \quad n = 66$$

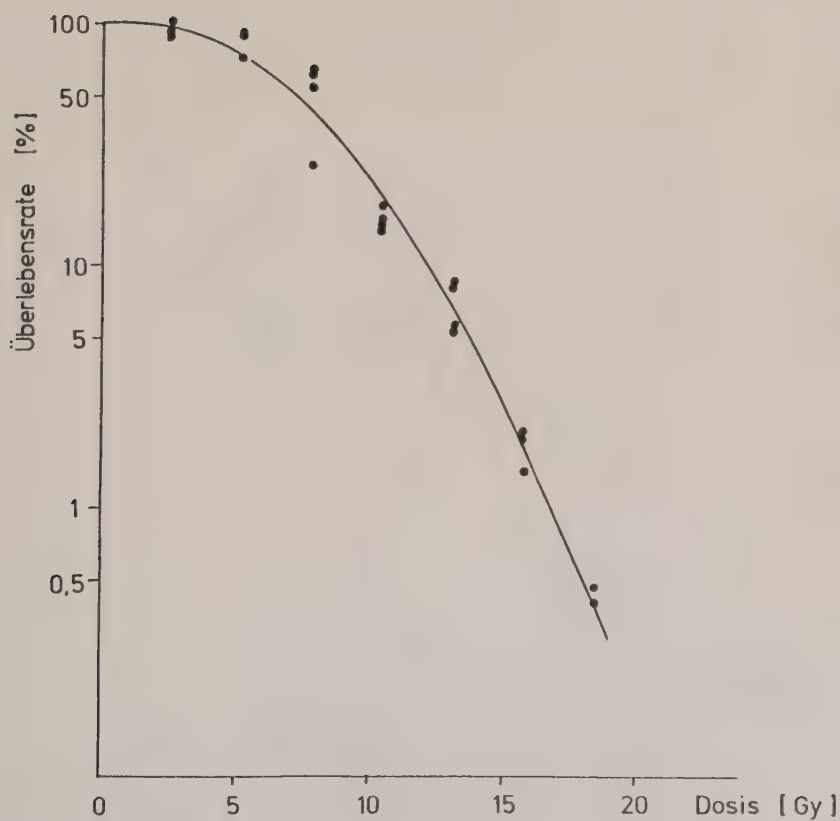


Abb. 2

Dosiseffektkurve von HAK Zellen bei Bestrahlung mit 4 gleichen Fraktionen im Abstand von je 3.5 Stunden. Eine gleichzeitig ermittelte Dosiseffektkurve bei Einzeitbestrahlung ist gegenübergestellt. Die Schulter der Einzeitstrahlendosiseffektkurve (-0-) wurde aus der Fraktionierungskurve konstruiert (vergl. Text). Jeder Punkt der Darstellung stellt die mittlere Überlebensrate eines Versuches dar, die sich aus den Überlebensraten von 4 Kulturflaschen ergibt.

Dosiseffektkurve bei fraktionierter Bestrahlung
 $D_0 = 3 \text{ Gy}$; $D_q = 11.2 \text{ Gy}$; $n = 150$

Dosiseffektkurve bei Einzeitbestrahlung
 $D_0 = 1.6 \text{ Gy}$; $D_q = 6.5 \text{ Gy}$; $n = 66$

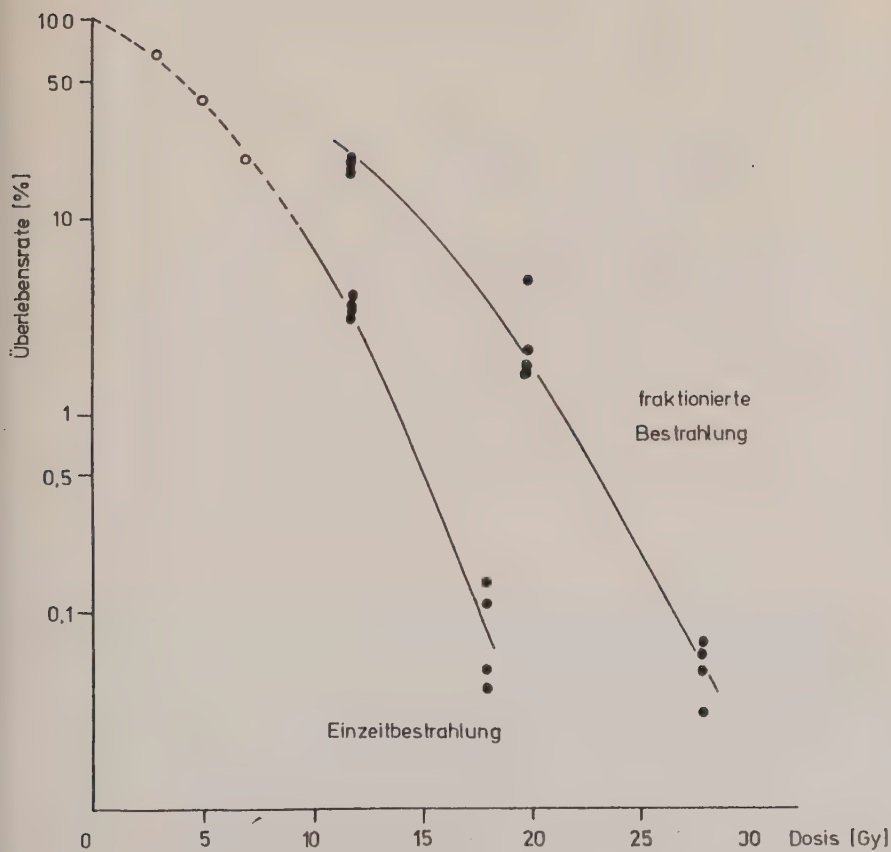


Abb. 3

Zeit-Konzentrationsbeziehung von Act D.
Aufgetragen sind die Überlebensraten gegen
die Expositionszeit. Das Act D wurde nach
den angegebenen Zeiten aus der Zellkultur
ausgewaschen. Jeder Punkt stellt die mittlere
Überlebensrate eines Versuches dar, die sich
aus den Überlebensraten von 4 Kulturflaschen
ergibt. Die eingezeichneten Geraden sind
das Ergebnis der nach der Methode der kleinsten
quadratischen Abweichung durchgeführten
Regressionsanalyse.

- Überlebensraten bei einer Act D Konzen-
tration von $0.5 \mu\text{g/ml}$
- Überlebensraten bei einer Act D Konzen-
tration von $1 \mu\text{g/ml}$

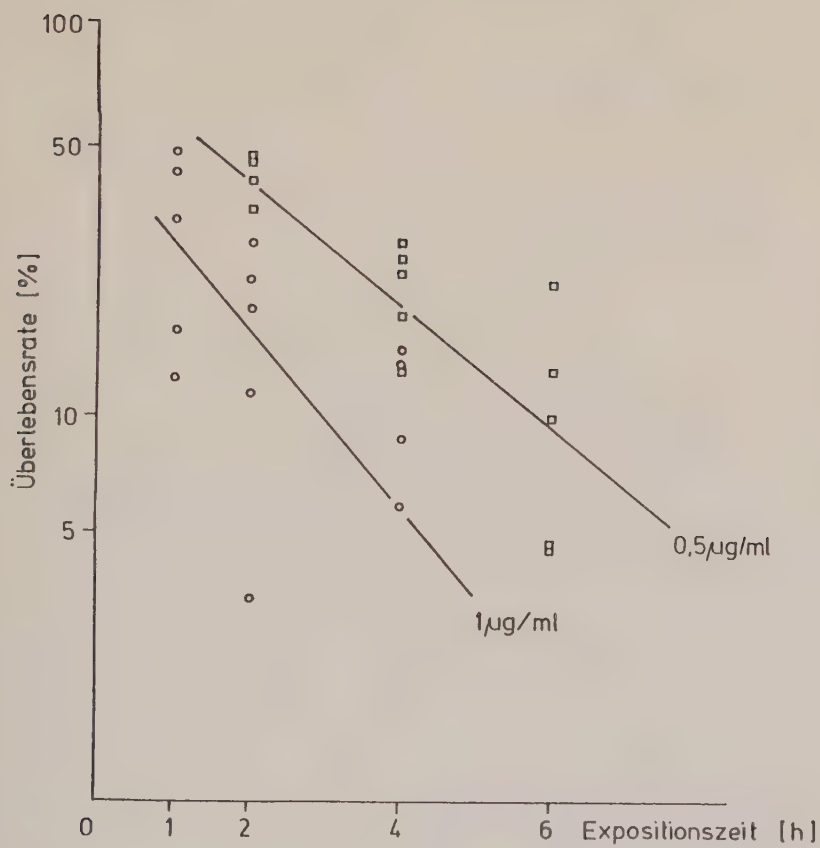


Abb. 4

Die Abhängigkeit der Überlebensrate bei gleicher Gesamtstrahlendosis von der Dauer des Fraktionierungsintervalles bei Bestrahlung mit 2 gleichen Fraktionen von 9 Gy.

Jeder Punkt stellt die mittlere Überlebensrate eines Versuches dar.

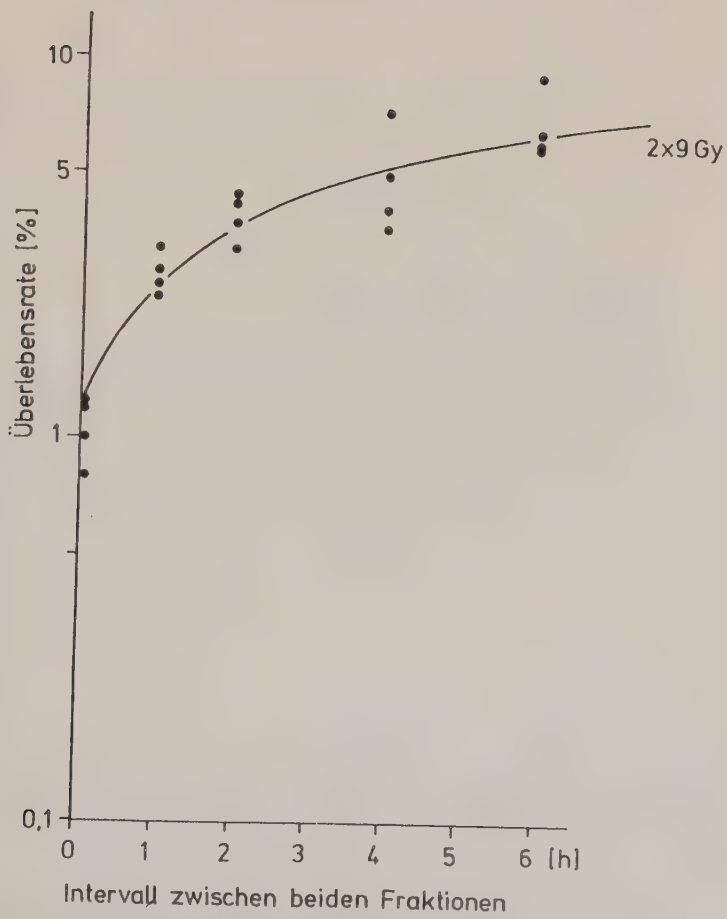


Abb. 5

Die Abhängigkeit der Überlebensraten der Zellen, die eine Behandlung mit Act D überlebt haben, von der anschließend gegebenen Strahlendosis. Die Überlebensrate nach Act D allein betrug 40 %. Jeder Punkt der Abbildung stellt die mittlere Überlebensrate eines Versuches dar.

Die Zellen wurden mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ Act D für 2 Stunden vorbehandelt. Zwischen Ende der Act D Exposition und der Bestrahlung lagen 2 Stunden, in denen die Zellen sich in normalem Kulturmedium befanden.

- Einzeitbestrahlung ohne Act D

$$D_o = 2.3 \text{ Gy}; D_q = 6.8 \text{ Gy}; n = 21$$

- Überlebensraten der Kombinationsbehandlung auf 100 % Überlebensrate der Act D Kontrolle normiert

$$D_o = 1.7 \text{ Gy}; D_q = 5.6 \text{ Gy}; n = 24$$

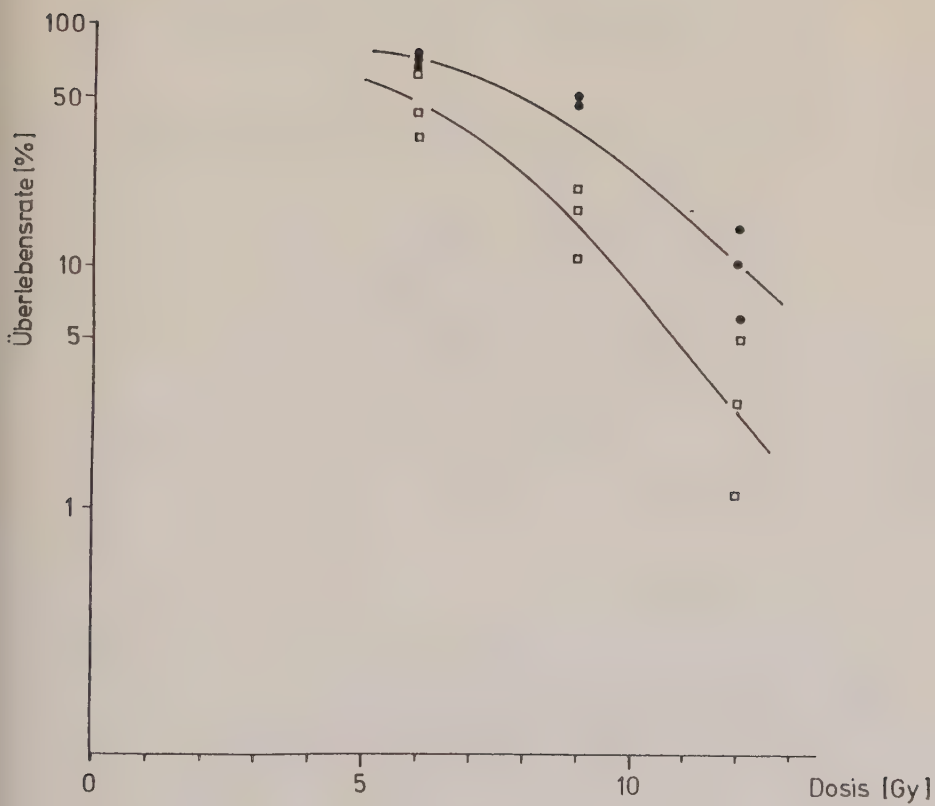


Abb. 6

Die Abhängigkeit der Überlebensrate von der Dosis der nach einem Intervall von 4 Stunden gegebenen 2. Fraktion, wobei die 1. Fraktion entweder aus 10 Gy Bestrahlung allein oder aus der gleichwirksamen Behandlung mit Act D plus 6 Gy bestand. Jeder Punkt der Abbildung stellt die mittlere Überlebensrate eines Versuches dar, die sich aus den Überlebensraten von 6 Kulturflaschen ergibt. Aufgetragen sind die Überlebensraten gegen die Strahlendosis der 2. Bestrahlungsfraktion.

- Vorbehandlung mit 0.5 µg/ml Act D für 2 Stunden plus 6 Gy - nach 4 Stunden 2. Bestrahlungsfraktion

$$D_0 = 2.35 \text{ Gy}; D_q = 1.05 \text{ Gy}$$

- Vorbehandlung mit 10 Gy Bestrahlung - nach 4 Stunden 2. Bestrahlungsfraktion

$$D_0 = 3.5 \text{ Gy}; D_q = 1.8 \text{ Gy}$$

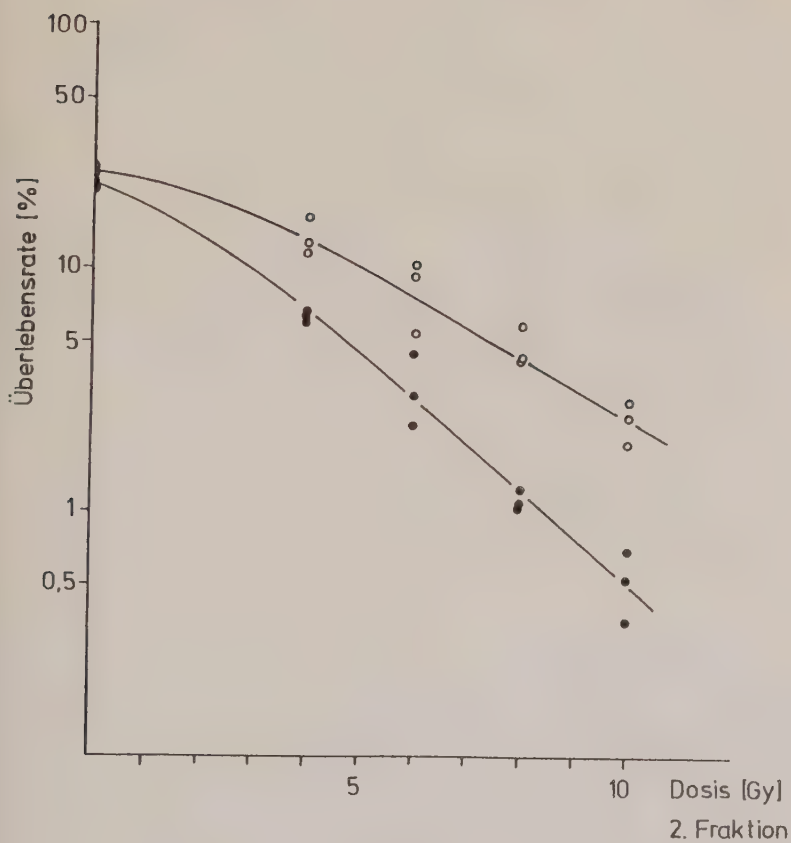


Abb. 7

Die Abhängigkeit der Überlebensrate von der Dosis der nach einem Intervall von 24 Stunden gegebenen 2. Fraktion, wobei die 1. Fraktion entweder aus 10 Gy Bestrahlung allein oder aus der Behandlung mit Act D plus 6 Gy bestand. Im Gegensatz zu den Versuchen in Abb. 6 war in diesen Versuchen die Wirkung der Kombination aus Act D plus 6 Gy größer als 10 Gy allein. Die Werte wurden nicht normiert. Jeder Punkt der Abbildung stellt die mittlere Überlebensrate eines Versuches dar, die sich aus den Überlebensraten von 6 Kulturflaschen ergibt. Aufgetragen sind die Überlebensraten gegen die Strahlendosis der 2. Bestrahlungsfraktion.

- Vorbehandlung mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Act D für 2 Stunden plus 6 Gy - nach 24 Stunden 2. Bestrahlungsfraktion

$$D_0 = 3.3 \text{ Gy}; D_q = 1.0 \text{ Gy}$$

- Vorbehandlung mit 10 Gy Bestrahlung - nach 24 Stunden 2. Bestrahlungsfraktion

$$D_0 = 4.7 \text{ Gy}; D_q = 2.0 \text{ Gy}$$

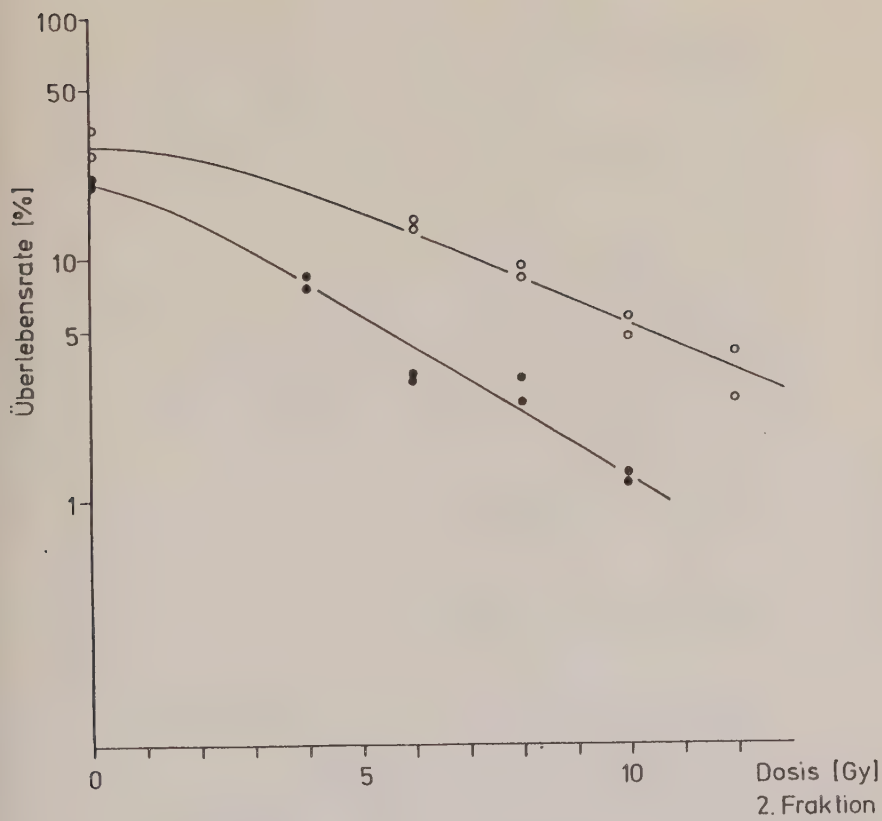


Abb. 8

Die Abhängigkeit der Erholung vom subletalen Strahlenschaden vom Zeitpunkt der Behandlung mit Act D.

Es sind die Überlebensraten bei Act D Anwendung vor einer Einzeitbestrahlung, vor einer fraktionierten Bestrahlung und im Intervall einer fraktionierten Bestrahlung vergleichend gegenübergestellt. Jeder Punkt der Abbildung stellt die mittlere Überlebensrate eines Versuches dar, die sich aus den Überlebensraten von 6 Kulturflaschen ergibt. Die Werte sind auf die Überlebensrate nach Act D Anwendung allein korrigiert, die als 100 % angesetzt wurde. Die Zellen der Kombinationsversuche wurden mit 0.5 µg/ml Act D für 2 Stunden behandelt. Zwischen dem Ende der Act D Exposition und der Bestrahlung lagen 2 Stunden, in denen die Zellen sich in normalem Kulturmedium befanden.

■ Einzeitbestrahlung mit 12 Gy ohne Act D

○ Mittlere Überlebensrate = 7.5 %

□ Fraktionierte Bestrahlung mit 2 x 6 Gy o. Act D

○ Mittlere Überlebensrate = 22 %

▼ Act D Behandlung 2 h vor Einzeitbestrahlung
mit 12 Gy

○ Mittlere Überlebensrate = 1.4 Gy

▼ Act D Behandlung 2 h vor fraktionierter Bestrahlung mit 2 x 6 Gy. Fraktionierungsintervall: 4 h

○ Mittlere Überlebensrate = 3.3 %

● Act D Behandlung im Intervall einer fraktionierten Bestrahlung mit 2 x 6 Gy. Fraktionierungsintervall: 4 h

○ Mittlere Überlebensrate = 3.3 %

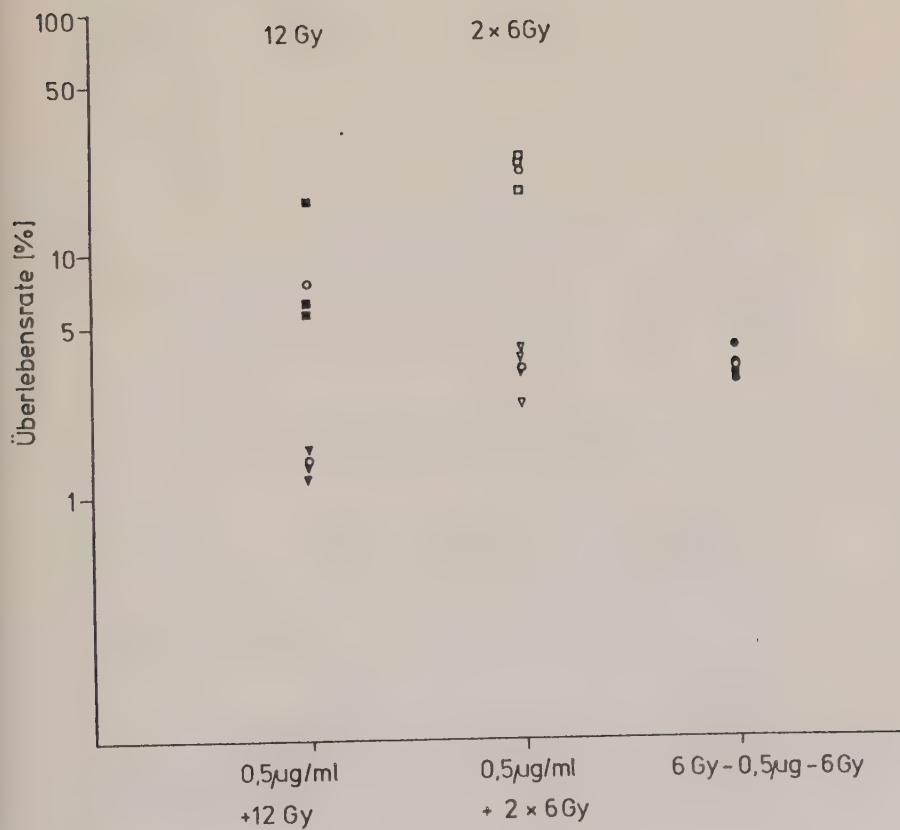


Abb. 9

Die Abhängigkeit der Erholung vom subletalen Strahlenschaden vom Zeitpunkt der Behandlung mit Act D.

Es sind die Überlebensraten bei Act D Anwendung vor einer Einzeitbestrahlung, vor einer fraktionierten Bestrahlung und im Intervall einer fraktionierten Bestrahlung vergleichend gegenübergestellt. Jeder Punkt der Abbildung stellt die mittlere Überlebensrate eines Versuches dar, die sich aus den Überlebensraten von 6 Kulturflaschen ergibt. Die Werte sind auf die Überlebensrate nach Act D Anwendung allein korrigiert, die als 100 % angesetzt wurde. Die Zellen der Kombinationsversuche wurden mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ Act D für 2 Stunden behandelt. Zwischen dem Ende der Act D Exposition und der Bestrahlung lagen 2 Stunden, in denen die Zellen sich in normalem Kulturmedium befanden.

■ Einzeitbestrahlung mit 18 Gy ohne Act D

○ Mittlere Überlebensrate = 1.8 %

□ Fraktionierte Bestrahlung mit 2×9 Gy o. Act D

○ Mittlere Überlebensrate = 6.5 %

▼ Act D Behandlung 2 h vor einer Einzeitbestrahlung mit 18 Gy

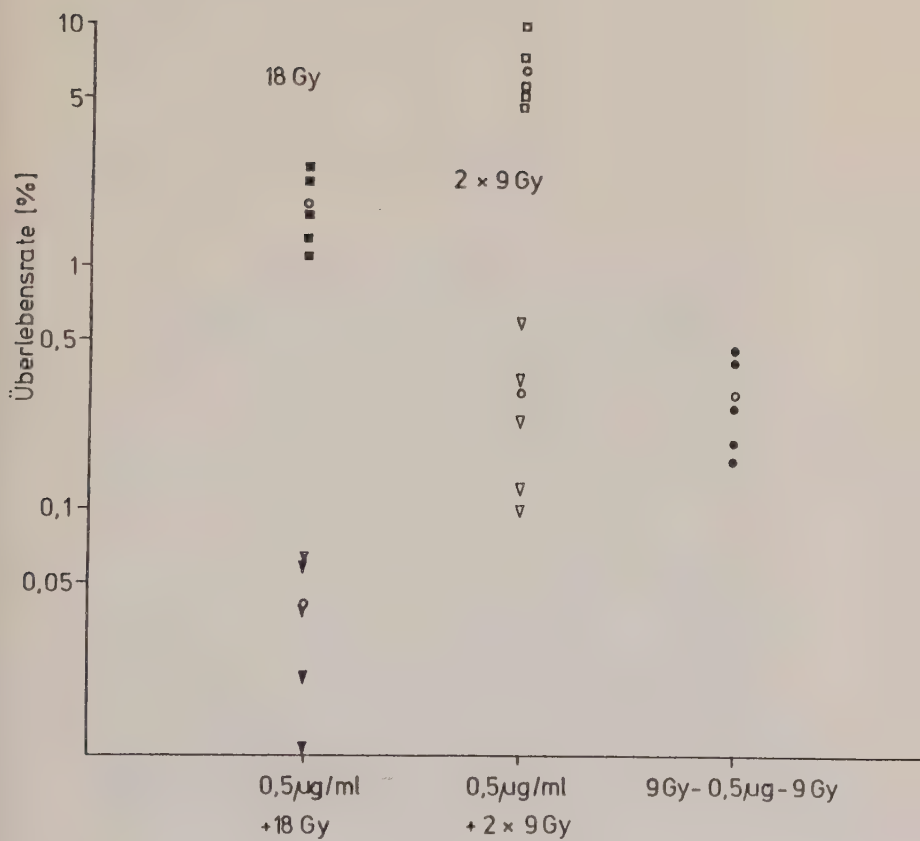
○ Mittlere Überlebensrate = 0.04 %

▼ Act D Behandlung 2 h vor einer fraktionierten Bestrahlung mit 2×9 Gy. Fraktionierungsintervall: 4 h

○ Mittlere Überlebensrate = 0.3 %

● Act D Behandlung im Intervall einer fraktionierten Bestrahlung mit 2×9 Gy. Fraktionierungsintervall: 4 h

○ Mittlere Überlebensrate = 0.3 %



5. Diskussion

5.1. Strahlendosiseffektkurve

In Abb. 1 ist die Dosiseffektkurve von HAK Zellen nach in-vitro Einzeitbestrahlung mit Gammastrahlen dargestellt. Im halblogarithmischen Maßstab zeigt sich eine sogenannte Schulterkurve, wie sie von Puck und Mitarbeiter (1956) erstmals für Säugetierzellen veröffentlicht wurde.

Die Kurve läßt sich in zwei Bereiche gliedern:

- einmal in den Bereich niedriger Dosis mit relativ geringer Wirkung, wodurch sich eine Schulter ergibt und
- zum zweiten in den exponentiellen Teil, wo der Logarithmus der Überlebensrate eine lineare Funktion der Dosis ergibt. Die Reaktivität nimmt also mit steigender Dosis zu, um schließlich einen konstanten Wert zu erreichen.

Nach Alper et al. (1960) gelten als hinreichende Definition solcher Kurven zwei Bestimmungsgrößen, die D_0 und die Extrapolationsnummer n .

D_0 wird als diejenige Dosis bezeichnet, die im geradlinigen Teil der Kurve die Zahl der jeweils überlebenden Zellen um den Faktor $1/e$ vermindert. Verlängert man den geradlinigen Verlauf der Kurve in Richtung Ordinate, so ergibt sich als Schnittpunkt mit dieser die Extrapolationszahl n .

Aus der vorliegenden Dosiseffektkurve ergeben sich für D_0 1.9 Gy und eine Extrapolationsnummer n von 66. Mathematisch läßt sich eine derartige Kurve mit der Formel

$$\bar{U}R = 1 - (1 - e^{-KD})^n$$

beschreiben. $\bar{U}R$ ist die Überlebensrate, e die Basis des natürlichen Logarithmus, K die Steigung des geradlinig verlaufenden Teils der Kurve, D die

Strahlendosis und n die Extrapolationsnummer.

Elkind und Mitarbeiter haben aus dem Verlauf solcher Kurven und dem Vorhandensein einer Schulter geschlossen, daß ein subletaler zellulärer Strahlenschaden vorhanden sein muß. Dieser häuft sich im Bereich niedriger Dosis bis zu einem Sättigungswert an. Aus der Kurve läßt sich also ableiten, daß der Strahlenschaden pro Zelle mit zunehmender Dosis wächst. Die Steigung der Kurve nimmt mit der Höhe der Strahlendosis zu. Mit dem Übergang in den exponentiellen Teil der Kurve ist die relative Wirkung am größten, d. h. der subletale Strahlenschaden hat sein Maximum erreicht. Überlebende Zellen sind in der Lage, den subletalen Strahlenschaden zu reparieren. Dieser Prozeß beginnt unmittelbar nach der Bestrahlung und ist bereits vor der nächsten Zellteilung beendet. Hierfür erbrachten Elkind und Mitarbeiter (1960) anhand von Fraktionierungsversuchen an chin. Hamsterzellen den Nachweis.

Vergleicht man die Parameter D_0 und die Extrapolationszahl n von HAK Zellen mit denen anderer Zellkulturen (Whitmore und Till 1964), so zeigt sich, daß HAK Zellen zu den strahlenresistentesten Zellen gehören. Bei einer Einzeldosis von 18 Gy überleben noch ca. 0.5 % der Zellen. Wird diese Dosis in vier Fraktionen aufgeteilt (wie in Abb. 2 dargestellt), so überleben noch ca. 4 % der Zellen. Dies zeigt deutlich, daß die Zellen in der Lage sind, den subletalen Strahlenschaden in der Zeit bis zum nächsten Bestrahlungsintervall zu reparieren.

5.2. Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung

Abb. 3 stellt die Abhängigkeit der Überlebensrate von der Expositionsdauer, sowie von der Konzentration des Act D bei HAK Zellen dar. Die Überlebensrate bei konstanter Konzentration nimmt mit zunehmender Expositionszeit exponentiell ab.

Aus den Kurven ergibt sich, daß für Act D der Effekt im Bereich zwischen einer Stunde und sechs Stunden vom Produkt aus Expositionsdauer (t) und Konzentration (c) abhängig ist. Diesen Zusammenhang kann man mathematisch mit folgender Gleichung darstellen:

$$\text{ÜR} = e^{-t \cdot c \cdot \text{const.}}$$

Für chin. Hamsterzellen und andere Gewebelinien haben Elkind und Mitarb. (1969) ebenfalls exponentiell abnehmende Überlebensraten beschrieben.

5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Kombinationsversuchen

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich durch eine Kombinationsbehandlung mit Act D eine Erhöhung der Strahlensensibilität bei asynchron wachsenden HAK Zellen erreichen läßt.

Die D_0 bei Einzeitbestrahlung (Abb. 5) beträgt 2.3 Gy. Diese erniedrigt sich durch Vorbehandlung mit Act D auf 1.7 Gy. Die D_q beträgt 5.6 Gy (d. h. 18 % weniger als in der Kontrolle) und $D_{0.1}$ 1.7 Gy (d. h. 26 % weniger als in der Kontrolle).

Wird Act D vor einer folgenden fraktionierten Bestrahlung (Abb. 6) angewandt, so vermindert sich D_0 gegenüber einer Kontrollldosiseffektkurve bei fraktionierter Bestrahlung von 3.5 Gy auf 2.35 Gy um 33 %. Auch die Schulter wird deutlich schmaler.

Dieser Effekt läßt sich auch nach einem verlängerten Fraktionierungsintervall von 24 Stunden (Abb. 7) beobachten. Hier beträgt die D_0 bei Bestrahlung ohne Act D 4.7 Gy. Diese vermindert sich nach Act D Anwendung auf 3.3 Gy um 30 %.

In Abb. 8 und 9 wird graphisch die Abhängigkeit der Überlebensrate vom Anwendungsmodus der Bestrahlung bzw. des Act D dargestellt. Die Überlebensraten sind auf 100 % Überlebensrate der Act D-Kontrolle normiert. Werden HAK Zellen mit 18 Gy Einzeldosis (Abb. 9) bestrahlt, so überleben im Durchschnitt noch 1.8 % der Zellen. Wird diese Dosis in zwei Fraktionen, bei einem Intervall von vier Stunden, aufgeteilt, dann überleben 6.5 % der Gesamtpopulation. Die Überlebensrate steigert sich also durch Fraktionierung um den Faktor 3,6. Wurden die Zellen vor der Bestrahlung mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$

Act D behandelt, so überlebten nach 18 Gy Einzeldosis noch 0.04 % der Zellpopulation. Bei Bestrahlung der Zellen nach Act D Behandlung mit zwei Fraktionen überlebten 0.3 %. Durch Fraktionierung steigert sich hier die Überlebensrate um den Faktor 5.

Wird Act D während des Fraktionierungsintervalles angewandt, überleben ebenfalls durchschnittlich 0.3 % der Zellen.

Abb. 8 stellt den gleichen Versuch wie Abb. 9 dar, jedoch beträgt die Gesamtstrahlendosis 12 Gy.

Hier steigert sich die Überlebensrate durch Fraktionierung der Strahlendosis von 7.5 % auf 22 % um den Faktor 3. Nach Vorbehandlung mit Act D steigt die durchschnittliche Überlebensrate (normiert auf 100 % Act D-Kontrolle) von 1.4 % bei Einzelbestrahlung auf 3.3 % bei fraktionierter Bestrahlung um den Faktor 2,3. Wird Act D während des Fraktionierungsintervalles appliziert, überleben ebenfalls durchschnittlich 3.3 % der Zellen.

5.4. Andere experimentelle Arbeiten

1964 zeigten Elkind, Whitmore und Alescio in ihren Experimenten, daß die Überlebensraten von chin. Hamsterzellen bei Bestrahlung mit Gammastrahlen bedeutend gesenkt werden konnten, wenn Act D während des bestrahlungsfreien Intervalls den Zellen zugegeben wurde. Ein ähnlicher Effekt konnte auch erzielt werden, wenn die Zellen im bestrahlungsfreien Intervall auf Zimmertemperatur (25°C) abgekühlt wurden.

Elkind schloß daraus, daß dieser Effekt dadurch erreicht wurde, daß Act D, wie auch die verminderte Temperatur die Reparatur des subletalen Strahlenschadens der Zelle verhinderte oder zumindest verzögert. Da relativ große Effekte bei sehr geringen Dosen Act D erreicht wurden, nahm Elkind an, daß RNA eine signifikante Rolle bei der Erholung vom subletalen Strahlenschaden spielte.

Nach Reich et al. (1961) und Hurwitz et al. (1962) wird bei geringen Dosen Act D selektiv die RNA-Polymerase gehemmt.

Elkind und Mitarbeiter (1967) führten Versuche an synchronisierten chin. Hamsterzellen V 79 durch, in denen die Zellen nach verschiedenen hohen Dosen Gammastrahlen mit einer nicht zytotoxischen Dosis von Act D behandelt wurden.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß eine zusätzlich gegebene Dosis Act D den Letaleffekt der Bestrahlung verstärken konnte, d. h. die Überlebensrate mindern konnte. Die D_0 wurde in diesem Versuch kaum beeinflusst, während D_q um 12 % vermindert, d. h. die Schulter verschmälert wurde.

War Act D bei fraktionierter Bestrahlung während des bestrahlungsfreien Intervalls vorhanden, so wurde D_q um 63 % gesenkt während D_0 nicht beeinflusst wurde.

Auch bei diesem Versuch wurden nicht zytotoxische Dosen Act D verwandt.

Elkind folgerte daraus, daß Act D, wenn es während des Intervalls zwischen zwei Fraktionen oder nach einer Einzeldosis Gammastrahlen vorhanden ist, die Reparatur der Zelle vom subletalen oder potentiell letalen Strahlenschaden verhindern kann.

Wurde dagegen nicht sofort nach der ersten Fraktion Act D angewandt, so war die Überlebensrate umso höher, je mehr Zeit die Zelle zwischen Bestrahlung und Act D-Anwendung zur Erholung hatte. Bei einem Intervall von 10 Stunden zwischen Bestrahlung und Act D-Gabe konnte kaum mehr ein Einfluß auf die Überlebensrate erzielt werden.

In weiteren Experimenten beobachteten Elkind und Sakkamoto (1969) an chin. Hamsterzellen V 79 eine Sensibilisierung gegenüber Gammastrahlen durch Act D. Wurde Act D vor einer Einzeitbestrahlung angewandt, so verminderte sich D_q und D_0 um 20 % gegenüber einer unbehandelten Kontrolle, obwohl keine zytotoxischen Konzentrationen von Act D zur Anwendung kamen. Auch wenn toxische Dosen angewandt wurden, reduzierte sich D_q in gleicher Weise um 20 - 25 %, während D_0 um bis zu 89 % reduziert wurde. Act D beeinflusste die Schulter der Strahlendosis-effektkurve einer nachfolgenden Bestrahlung dosisunabhängig, während D_0 dosisabhängig beeinflusst wurde.

In weiteren Experimenten von Elkind und Sakkamoto (1969) an chin. Hamsterzellen wirkte Act D zwischen zwei Fraktionen Gammastrahlen auf die Zellen ein. Auch hier konnte gezeigt werden, daß Act D die Weite der Schulter dosisunabhängig beeinflusst, während die Steilheit der exponentiellen Geraden der Überlebenskurve (D_0) dosisabhängig beeinflusst wird.

5.5. Auswirkung von Actinomycin D auf HAK Zellen

In vielen experimentellen Arbeiten, wie auch bei klinischen Beobachtungen, wurde ein radiosensibilisierender Effekt von Act D auf Säugetierzellen nachgewiesen. Elkind et al. (1964) führten diesen Effekt darauf zurück, daß Act D in der Lage ist die Reparatur des kumulierten subletalen und potentiell letalen Strahlenschadens der Zelle zu verhindern. Alle diese Versuche wurden mit nichtzytotoxischen Dosen von Act D bei synchronisierten chin. Hamsterzellen V 79 durchgeführt. Von diesen in-vitro Experimenten wurde die Kombinationstherapie an menschlichen Tumoren abgeleitet.

Wird Act D vor einer Einzeitbestrahlung mit Gammastrahlen angewandt, so kann man eine verstärkte Wirkung der Bestrahlung beobachten. Sowohl die Weite der Schulter, als auch die Steilheit der Geraden (D_0) wird beeinflusst. Die bei HAK Zellen beobachtete Verkleinerung der Schulterweite um 18 % und das Steilerwerden der Kurvengeraden um 26 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 5) stimmt mit den Werten, die Elkind für chin. Hamsterzellen mit 20 - 25 % angibt, überein. Weiter gab Elkind an, daß die Weite der Schulter dosisunabhängig, die Steilheit der Geraden jedoch dosisabhängig beeinflusst wird. Dies wurde an HAK Zellen nicht weiter untersucht.

Wird Act D vor einer fraktionierten Bestrahlung angewandt, so sind die Effekte wesentlich ausgeprägter. Die D_0 wird um 33 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle vermindert. Auch nach einem verlängerten Fraktionierungsintervall von 24 Stunden könnten die gleichen Effekte beobachtet werden. Hier wurde die D_0 um 30 % gegenüber einer unbehandelten Kontrolle vermindert.

In beiden Experimenten war Act D nur vor der

Bestrahlung und nicht während der Reparaturphase anwesend. Durch die Fraktionierung der Strahlendosis jedoch wurde der Einfluß des Act D auf die Strahlenwirkung verstärkt.

In einem weiteren Experiment wurden die Überlebensraten bei Anwendung von Act D vor einer Einzelbestrahlung mit denen bei Anwendung vor einer fraktionierten Bestrahlung und im Intervall einer fraktionierten Bestrahlung verglichen (Abb. 8 und 9). Hier konnte in einem Fall ($0.5 \mu\text{g/ml}$ Act D und 18 Gy Gesamtstrahlendosis) eine Steigerung der Überlebensrate um den Faktor 5 beobachtet werden. In der Kontrolle wurde durch Fraktionierung eine Steigerung der Überlebensrate um den Faktor 3.6 erzielt. Wurde Act D während des behandlungsfreien Intervalls appliziert, so ergab sich exakt die gleiche Überlebensrate wie bei der Anwendung vor der Bestrahlung.

Auch bei etwas niedrigerer Gesamtdosis (12 Gy) wurden ähnliche Ergebnisse festgestellt.

Bei fraktionierter Bestrahlung nach Act D Vorbehandlung (Abb. 8) war die Überlebensrate um den Faktor 2.3 höher gegenüber der Einzelbestrahlung. In der Kontrolle überlebten 3-mal mehr Zellen bei fraktionierter Bestrahlung, als bei Einzelbestrahlung. Bei Anwendung des Zytostatikums während des Fraktionierungsintervalls überlebten auch hier exakt genausoviele Zellen wie bei Anwendung vor einer fraktionierten Bestrahlung.

Bemerkenswert ist, daß der Fraktionierungseffekt umso ausgeprägter ist, je höher die Gesamtstrahlendosis ist.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Beobachtungen von Elkind et al. (1964 und 1969) an chin. Hamster-Zellen. Dort konnten die Überlebensraten stark gesenkt werden, wenn Act D während des bestrahlungsfreien Intervalls anwesend war. Diese Tatsache

wurde mit der Annahme erklärt, daß Act D in der Lage ist den subletalen Strahlenschaden der Zelle zu reparieren.

Bei HAK Zellen jedoch kann man keinen Unterschied in der Wirkung bei Anwendung vor der fraktionierten Bestrahlung von derjenigen bei Anwendung während des Fraktionierungsintervalles sehen.

Wenn Act D die Zellen strahlensensibilisieren würde, indem es die Reparaturvorgänge der Zelle hemmt, so müßte die Überlebensrate deutlich erniedrigt sein, wenn es während der Reparaturphase, also während des bestrahlungsfreien Intervalls, anwesend ist. Dies ist bei HAK Zellen nicht der Fall.

5.6. Schlußfolgerung aus den Experimenten

Actinomycin D wirkt bei menschlichen Nierentubuluszellen deutlich sensibilisierend gegenüber Gammastrahlen durch Verminderung der Schulter und einer steileren Kurvengeraden, also im Sinne einer Dosismodifikation und synergistisch nach der Definition von Dewey (1970).

Es kann jedoch keine Radiosensibilisierung im Sinne einer Hemmung der Reparatur des subletalen Strahlenschadens bei HAK Zellen gesehen werden.

Bei der Anwendung von Act D sowohl vor einer fraktionierten Bestrahlung als auch im Fraktionierungsintervall (Reparaturphase) überleben bei HAK Zellen gleich viele Zellen.

Die an chin. Hamsterzellen beobachtete Reparaturhemmung des subletalen Strahlenschadens läßt sich wohl nicht uneingeschränkt auf menschliche Zelllinien übertragen. Wahrscheinlich gibt es sogar erhebliche Unterschiede innerhalb der Zelllinien einer Spezies. So kann man wahrscheinlich auch nicht ohne weiteres von Beobachtungen an gesunden menschlichen Nierenepithelien auf das Verhalten von pathologischen Tumorgewebe gegenüber Act D schließen. Interaktionen von Act D und Gammastrahlen in anderen Geweben müßten noch in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Act D einen strahlensensibilisierenden Effekt auf gesunde menschliche Zellen hat.

Ebenso war die Frage zu behandeln, ob Act D in der Lage ist die Reparatur des kumulierten subletalen und potentiell letalen Strahlenschadens der Zelle zu verhindern.

Verwendet wurden zu den Experimenten gesunde menschliche Nierentubulusepithelien in der Zellkultur.

Bei Anwendung von Act D vor einer Einzelbestrahlung kann eine deutliche Sensibilisierung der Zellen gegenüber Gammastrahlen beobachtet werden. Die Weite der Schulter in der Dosiseffektkurve wird um 18 % schmaler und die Kurve wird um 26 % steiler.

Durch Fraktionierung der Strahlendosis kann dieser Effekt noch deutlich verstärkt werden.

Die Reparatur des subletalen Strahlenschadens bei HAK Zellen wird jedoch nicht gehemmt. Es überleben gleich viele Zellen bei einer Zytostatikumanwendung vor einer fraktionierten Bestrahlung wie bei der Anwendung während des Fraktionierungsintervalls (Reparaturphase).

7. Literaturverzeichnis

1. Alper, T., Gilles, N. E., Elkind M. M.:
The sigmoid survival curve in radiobiology
Nature 186: 1062-1063 (1960)
2. Aron, B. S., MD, DMRT: Wilms' Tumor - a clinical
study of eighty one patients
Cancer 33: 637-646 (1974)
3. Bacchetti S., Whitmore G. F.:
Actinomycin D: Effect on Mouse-L-Cells
Biophys. J., 9: 1427-1445 (1969)
4. Belli, J. A., Bonte F. J.:
Influence of temperature on the radiation
response of mammalian cells in tissue culture
Rad. Res. 18: 272-276 (1963)
5. Cerami, A., Reich E., Ward D. C., Goldberg J. H.:
The interaction of actinomycin with DNA. Require-
ment for the 2-amino group of purines.
Proc. Nat. Acad. Sci. 57: 1036-1042 (1967)
6. Dewey, D. L., Miller H. H.:
Effects of temperature on x-ray-induced cell
lethality and chromosomal observations
Int. J. Rad. Biol. 18: 91-93 (1970)
7. Elkind M. M., Sutton H.:
x-ray damage and recovery in mammalian cells
in culture,
Nature 184: 1293-1295 (1959)

8. Elkind, M. M., Sutton H.:
Radiation response of mammalian cells grown
in culture. I. Repair of x-ray damage in
surviving Chinese Hamster Cells
Rad. Res. 13: 556-593 (1960)
9. Elkind, M. M., Whitemore, G. F., Alescio, T.:
Actinomycin D: Suppression of recovery in
x-irradiated mammalian cells
Science 143: 1454-1457 (1964)
10. Elkind, M. M.:
Sublethal x-ray damage and its repair in
mammalian cells
Rad. Res.: 558-586 (1967)
11. Elkind, M. M., Sutton-Gilbert, H., Moses, W. B.,
Kamper, C.:
sublethal and lethal radiation damage
Nature 214: 1088 (1967)
12. Elkind, M. M., Sakamoto, K., Kamper C.:
Age-dependent toxic properties of actinomycin D
and x-rays in culture of Chinese Hamster Cells
Cell Tissue Kinet. 1: 209-224 (1968)
13. Elkind, M. M., Kano, E., Sutton-Gilbert H.:
Cell killing by actinomycin D in relation
to the growth cycle of Chinese Hamster Cells
J. Cell. Biol. Vol. 42 366-377 (1969)
14. Elkind, M. M., Sakamoto, K.:
Combined effects of x-irradiation and chemothera-
peutic drugs (nitrogen mustard and actinomycin D)
Front. Rad. Ther. Onc., Vol. 4: 53-75 (1969)

15. Elkind, M. M., Kano, E.:
Actinomycin D and radiation fractionation
studies in asynchronous and synchronized
Chinese Hamster Cells
Rad. Res. 44: 484-497 (1970)
16. Farber, S., D'Angio, G., Evans, A., et al.:
Clinical studies of actinomycin D with special
reference to Wilms'tumor in children
Acad. Sci. 89: 421-425 (1960)
17. Farber, S., MD:
Chemotherapy in the treatment of leukemia
and Wilms'tumor
J. Am. Med. Assoc., 198: 154-164 (1966)
18. Gellert, M., Smith, C. E., Neville, D.,
Felsenfeld, G.:
Actinomycin D binding to DNA. Mechanism and
specifity
J. molec. Biol. 11: 445-457 (1965)
19. Goldberg, I. H., Rabinowitz, M.:
Actinomycin D inhibition of nucleic acid
dependent synthesis of ribonucleic acid
Science 136: 315-316 (1962)
20. Goldberg, I. H., Rabinowitz, M., Reich, E.:
Basis of actinomycin action
Proc. Nat. Acad. Sci. 48: 2094 (1962)
21. Gursky, G. V.:
Structure of DNA-actinomycin complex
J. molec. Biol. 3: 749-757 (1969)

22. Hartmann, G., Coy, U., Kniese, G.:
Zum biolog. Wirkungsmechanismus der Actinomycine
Z. physiol. Chem. 330: 227-233 (1962)
23. Hurwitz, J., Furth, J. I., Malamy, M., Alexander, M.:
The role of desoxyribonucleic acid in ribo-
nucleic acid synthesis. III. The inhibition of
the enzymatic synthesis of ribonucleic acid
and desoxyribonucleic acid by actinomycin D
and proflavin
Proc. nat. Acad. Sci. 48: 1222-1230 (1962)
24. Kirk, J.:
The mode of action of actinomycin D.
Biochem. biophys. Acta 42: 167-169 (1960)
25. Perry, R. P.:
Selective effects of actinomycin D on the
intracellular distribution of RNA synthesis
in tissue culture cells
Exp. Cell Res. 29: 400 (1963)
26. Phillips, F. S., Schwartz, H. S., Sternberg, S. S.,
Tan, Ch. T. C.:
The toxicity of actinomycin D
A. of the N. Y. Acad. of sciences 89: 348-360 (1960)
27. Phillips, Th. L., Moody, D. W., Margolis, L. W.:
Modification of radiation injury to normal tissues
by chemotherapeutic agents
Cancer 35: 1678-1684 (1975)
28. Phillips, Th. L., et al.:
Quantification of combined radiation therapy
and chemotherapy effects on critical normal tissues
Cancer 37: 1186-1200 (1976)

29. Phillips, Th. L., MD. FU. K. K., MD:
Chemical modification of radiation effects
Cancer 39: 987-999 (1977)
30. Phillips, Th. L.:
Tissue toxicity of radiation-drug interactions
Editor: Sokol G. H., Maickel R. P.: Radiation-
drug interactions in the treatment of cancer
New York (1980)
31. Puck, T. T., Marens P. I.:
Action of x-ray on mammalian cells
J. Exp. Med. 103: 653-666 (1956)
32. Ravdin, R. G., Elkins W. L.:
Chemotherapy of solid tumors
Surg. Clin. Am. 40: 1641-1656 (1960)
33. Reich, E., Franklin, R. M., Shatkin, A. J.,
Tatum, E. L.:
Effekt of actinomycin D on cellular nucleic
acid synthesis and virus production
Science 134: 556-557 (1961)
34. Reich, E.:
Actinomycin: correlation of structure and
and function of its complexes with purines and DNA
Science 143: 684-689 (1964)
35. Scaiffée, J. F., Brohée, H.:
An investigation of factors influencing mitotic
G₂ delay in synchronous cultures of human kidney
cells after x-irradiation
Canad. J. Biochem. 47: 237-249 (1969)

36. Sinclair, W. K.:
Dependence of radiosensitivities upon cell age
In: Time and Dose Relationships in Radiation
Biology as Applied to Radiotherapy
Brookhaven Nat. Lab. Rep. 50203: 97 (1969)
37. Vining, L. C. Waksman, S. A.:
Paper chromatographic identification of the
actinomycins
Science 120: 389-391 (1954)
38. Whitmore, G. F., Till, J. E.,
Quantification of cellular radiation responses
Am. Rev. Nucl. Sci. 14: 347-374 (1964)
39. Whitmore, G. F., Borsa, J., Bacchetti S.,
Graham, F.:
Mammalian cell killing by inhibitors of DNA
synthesis. Normal and malignant cell growth.
ed. by R. Fry et al, Cancer Res. 17 (1969)

Lebenslauf

Josef Baur, geboren am 07.03.1955 in Aichach

Eltern: Juliane und Josef Baur

1961 - 1970 Besuch der Volksschule Inchenhofen
 und Hollenbach

1970 - 1973 kaufmännische Lehre in Schrobenhausen
 und Abschluß als Bürokaufmann

1971 - 1974 Besuch der Abendkurse der Berufsauf-
 bauschule Schrobenhausen

1974 Fachschulreife

1974 - 1978 Besuch des altsprachlichen Kollegs
 St. Matthias in Wolfratshausen-Waldram

1978 Abitur

1979 Beginn des Studiums der Humanmedizin
 an der Ludwig-Maximilians-Universität
 in München

1981 Ärztliche Vorprüfung

1982 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

1984 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Seit 1983 bin ich verheiratet.

Wir haben ein Kind.

